

# PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference <b>P03-0181PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See item 4 below
International application No. <b>PCT/JP2004/009675</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>01 July 2004 (01.07.2004)</b>	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) <b>29 January 2004 (29.01.2004)</b>
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant <b>KEIO UNIVERSITY</b>		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- |                                     |              |   |
|-------------------------------------|--------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. I    | Basis of the report   |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. II   | Priority  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. III  | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. IV   | Lack of unity of invention  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. V    | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. VI   | Certain documents cited   |
| <input type="checkbox"/>            | Box No. VII  | Certain defects in the international application  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Box No. VIII | Certain observations on the international application   |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Date of issuance of this report <b>22 August 2006 (22.08.2006)</b>
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold; margin-top: 10px;">Masashi Honda</div> e-mail: pt08@wipo.int

# PATENT COOPERATION TREATY

TRANSLATION

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To:

Date of mailing  
(day/month/year)

Applicant's or agent's file reference

**P03-0181PCT**

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraph 2 below

International application No.

**PCT/JP2004/009675**

International filing date (day/month/year)

**01.07.2004**

Priority date (day/month/year)

**29.01.2004**

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

Applicant

**KEIO UNIVERSITY**

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/JP

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. I

Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.  
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language  
\_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
  - a. type of material  
☐ a sequence listing  
☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material  
☐ in written format  
☐ in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing  
☐ contained in the international application as filed.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application  
☒ claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The inventions of claims 8, 9, 17, 18, and 35-40 concern treatment of the human body by therapy.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40

- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. IV

Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has:
- ☒ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest
  - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ .complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:
- See supplemental box.
4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts
  - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7, 10-16, 19-34, 41-43

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
**PCT/JP2004/009675**

Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
<b>1. Statement</b>			
Novelty (N)	Claims	<u>30, 32, 33</u>	YES
	Claims	<u>1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>30, 32, 33</u>	YES
	Claims	<u>1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-7, 10-16, 19-34, 41-43</u>	YES
	Claims	<u></u>	NO
<b>2. Citations and explanations:</b>			
<p>Document 1: JAGGER, Justin E. et al., Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001 Vol. 280 p. H2833-2839</p> <p>Document 2: Yasunobu HIRATA, "Koketsuatsu to NO," Igaku no Ayumi, 2003, Vol. 204, No. 9, p. 607-610</p> <p>Document 3: FULLERTON, Davis A., et al., Adenosine is a selective pulmonary vasodilator in cardiac surgical patients, CHEST, 1996, Vol. 109, p. 41-46</p> <p>Document 4: DIJI, A. et al., The local effect of carbon dioxide on human blood vessels, Am. Heart J., 1960, Vol. 60, p. 907-914</p> <p>Document 5: AGRAWAL B. et al., Acute effects of bezafibrate on blood pressure and renal haemodynamics in SHR and WKY rats, Nephrol. Dial. Transplant, 1998, Vol. 13, p. 333-339</p> <p>Document 6: SPRAGUE, Randy S. et al., Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity, American Journal of Physiology, 1998, Vol. 275, p. H1726-H1732</p> <p>Document 7: KOZMA, Fruzsina et al., Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels., Am. J. Physiol., 1999, Vol. 276, p. R1087-1094</p> <p>Document 8: LANDRY, Donald W. et al., The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog, J. Clin. Invest. 1992, Vol. 89, p. 2071-2074</p> <p>Document 9: JP 2001-507375 A (Takashi YONETANI) 5 June 2001 &amp; WO 99/01146 A1</p> <p>Document 10: JP 6-16693 A (Research Institute for Production Development) 25 January 1994 (Family: none)</p> <p>Document 11: JP 11-512463 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 26 October 1999 &amp; WO 97/10265 A1</p>			

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. VIII      Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**Claims 41-43**

The inventions of claims 41-43 of this application describe "a band 3 protein anion transmission function inhibitor," but only sulfonylurea is specifically listed as such a substance in the specification of this application. This authority finds that it was not clear to persons skilled in the art what kind of substance other than sulfonylurea is "a band 3 protein anion transmission function inhibitor" at the time this application was filed.

This being the case, the inventions of claims 41-43 of this application are not sufficiently supported by the specification.

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Box IV.

Claims 4-6:

In light of the fact that a "promoter of ATP release from erythrocytes, comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state" is the specified invention of claim 1 of this application; this authority finds that the common subject matter with claim 4, "a pharmaceutical composition comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state," lies in the "pharmaceutical composition comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state." However, as described in the document listed below, since drugs comprising carbon dioxide as an active ingredient that are capable of promoting ATP release from erythrocytes are already publicly known, this authority finds that a comparison with prior art shows that the novel main features of these two claims are not the same.

Furthermore, this authority finds no common technical issues in these two claims that have not been resolved before the filing date of this application.

Therefore, the subject matter of claims 4-6 of this application does not constitute one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 10-16:

This authority finds that the common subject matter of claim 10 of this application, "an inhibitor of ATP release from erythrocytes, comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its R-state," and the above specified invention lies in "the control of ATP release through stabilization of the structure of hemoglobin in erythrocytes." However, as noted above, this feature is already publicly known.

Therefore, for the same reason as noted above, the subject matter of claims 10-16 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 19-33:

This authority finds that the subject matter of claim 19 of this application, "erythrocytes wherein the structure of hemoglobin has been stabilized in its T-state," and the subject matter of claims 25-33, "a pharmaceutical composition comprising such erythrocytes" are common to the above specified invention with respect to "stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state." However, as noted above, this feature is already publicly known.

Therefore, for the same reason as noted above, the subject matter of claims 19-33 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The same applies to claims 22-24.

Claims 34-38:

This authority finds that the novel main feature of the subject matter of claim 34 of this application, "an ATP assay method characterized by carrying out quantitative determination of ATP released from erythrocytes with dependence on oxygen concentration," is not the same as that of the above specified invention because it does specify an ATP assay method wherein the ATP release promoter of the specified invention is used. Furthermore, this authority finds no common technical issues in these two claims that have not been resolved before the filing date of this application.



WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Supplemental Box

Continuation of: Box IV.

Therefore, the subject matter of claims 34-38 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 41-43:

Because in claim 41 the active ingredients contained therein are different from those of the specified invention, this authority finds that the only common matter between the subject matter of claim 41 of this application and the above specified invention lies in the application thereof, i.e., "the control of ATP release from erythrocytes." However, as noted above, this application is already publicly known.

Therefore, as noted above, the subject matter of claims 41-43 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Reference: JAGGER, Justin E. et al., Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, p H2833-2839

Supplemental Box

Continuation of: Box V.

**Novelty and Inventive Step:**

**Claims 1-7, 10-15, and 34**

Document 1 states that carbon dioxide promotes the release of ATP from erythrocytes (page H2833, Abstract; Figures 2 and 3), and it describes the enzyme concentration-dependent quantitation of ATP released from erythrocytes (METHODS).

Therefore, based on the description in document 1, the inventions of claims 1-7, 10-15, and 34 of this application lack novelty and an inventive step.

**Claims 1-7**

Document 2 states that NO has a powerful vasodilating action (page 607, Abstract).

Document 3 states that adenosine has a powerful vasodilating action (page 41, Abstract).

Document 4 states that carbon dioxide has a powerful vasodilating action (page 907).

Document 5 states that bezafibrate has a hypotensive effect and blood flow correcting effect.

Therefore, based on the descriptions in documents 2-5, the inventions of claims 1-7 of this application lack novelty and an inventive step.

**Claims 10-15 and 41-43**

Document 6 states that glibenclamide, which is one type of sulfonylurea, inhibits the release of ATP from erythrocytes (page H1726, Abstract).

Therefore, based on the description in document 6, the inventions of claims 10-15 and 41-43 of this application are refuted of novelty and an inventive step.

**Claims 10-16**

Document 7 states that carbon monoxide has a vasoconstrictive action (page R1087, Abstract).

Therefore, based on the description in document 7, the inventions of claims 10-16 of this application lack novelty and an inventive step.

**Claims 10-16 and 41-43**

Document 8 states that glibenclamide has the function of causing vessels to constrict (page 2071, Abstract).

Therefore, based on the description in document 8, the inventions of claims 10-16 and 41-43 are refuted of novelty and an inventive step.

Supplemental Box

Continuation of: Box V.

Claims 19-21 and 25

Document 9 describes erythrocytes that have been treated with NO (Claims 1-21; Example 4).

Therefore, based on the description in document 9, the inventions of claims 19-21 and 25 of this application are refuted of novelty and an inventive step.

Claims 22-24 and 31

Document 10 describes erythrocytes that have been treated with carbon monoxide (Claims 1-5).

Therefore, based on the description in document 10, the inventions of claims 22-24 and 31 lack novelty and an inventive step.

Claims 25-29

Document 11 describes an agent for the treatment of myocardial infarction and thrombosis having erythrocytes containing nitrosated hemoglobin as an active ingredient (Claims 30 and 31).

Therefore, based on the description in document 11, the inventions of claims 25-29 lack novelty and an inventive step.

Claims 30-33

As described in document 11, nitrosated hemoglobin can be used to treat myocardial infarction, but document 11 does not describe or suggest that such hemoglobin is useful for the treatment of acidosis.

In addition, document 12 describes the use of sulfonylurea in the treatment of septic shock.

However, document 12 does not describe or suggest the use of erythrocytes treated with sulfonylurea and the like in the treatment of septic shock.

Therefore, the inventions of claims 30-33 of this application are not refuted of novelty and an inventive step with respect to the documents listed in the international search report.

# PATENT COOPERATION TREATY

TRANSLATION

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To:

Date of mailing  
(day/month/year)

Applicant's or agent's file reference

**P03-0181PCT**

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraph 2 below

International application No.

**PCT/JP2004/009675**

International filing date (day/month/year)

**01.07.2004**

Priority date (day/month/year)

**29.01.2004**

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

Applicant

**KEIO UNIVERSITY**

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/JP

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. I

Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.  
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language  
\_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
  - a. type of material  
☐ a sequence listing  
☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material  
☐ in written format  
☐ in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing  
☐ contained in the international application as filed.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/JP2004/009675

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application  
☒ claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The inventions of claims 8, 9, 17, 18, and 35-40 concern treatment of the human body by therapy.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 8, 9, 17, 18, 35-40

- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

- ☐ has not been furnished  
☐ does not comply with the standard

the computer readable form

- ☐ has not been furnished  
☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. IV

Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has:
- ☒ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest
  - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental box.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts
  - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7, 10-16, 19-34, 41-43

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/JP2004/009675

<b>Box No. V</b>	<b>Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</b>		
<b>1. Statement</b>			
Novelty (N)	Claims	30, 32, 33	YES
	Claims	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	NO
Inventive step (IS)	Claims	30, 32, 33	YES
	Claims	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 10-16, 19-34, 41-43	YES
	Claims		NO
<b>2. Citations and explanations:</b>			
<p>Document 1: JAGGER, Justin E. et al., Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001 Vol. 280 p. H2833-2839</p> <p>Document 2: Yasunobu HIRATA, "Koketsuatsu to NO," Igaku no Ayumi, 2003, Vol. 204, No. 9, p. 607-610</p> <p>Document 3: FULLERTON, Davis A., et al., Adenosine is a selective pulmonary vasodilator in cardiac surgical patients, CHEST, 1996, Vol. 109, p. 41-46</p> <p>Document 4: DJI, A. et al., The local effect of carbon dioxide on human blood vessels, Am. Heart J., 1960, Vol. 60, p. 907-914</p> <p>Document 5: AGRAWAL B. et al., Acute effects of bezafibrate on blood pressure and renal haemodynamics in SHR and WKY rats, Nephrol. Dial. Transplant, 1998, Vol. 13, p. 333-339</p> <p>Document 6: SPRAGUE, Randy S. et al., Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity, American Journal of Physiology, 1998, Vol. 275, p. H1726-H1732</p> <p>Document 7: KOZMA, Fruzsina et al., Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels., Am. J. Physiol., 1999, Vol. 276, p. R1087-1094</p> <p>Document 8: LANDRY, Donald W. et al., The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog, J. Clin. Invest. 1992, Vol. 89, p. 2071-2074</p> <p>Document 9: JP 2001-507375 A (Takashi YONETANI) 5 June 2001 &amp; WO 99/01146 A1</p> <p>Document 10: JP 6-16693 A (Research Institute for Production Development) 25 January 1994 (Family: none)</p> <p>Document 11: JP 11-512463 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 26 October 1999 &amp; WO 97/10265 A1</p>			



WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/009675

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 41-43

The inventions of claims 41-43 of this application describe "a band 3 protein anion transmission function inhibitor," but only sulfonyleurea is specifically listed as such a substance in the specification of this application. This authority finds that it was not clear to persons skilled in the art what kind of substance other than sulfonyleurea is "a band 3 protein anion transmission function inhibitor" at the time this application was filed.

This being the case, the inventions of claims 41-43 of this application are not sufficiently supported by the specification.

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Box IV.

Claims 4-6:

In light of the fact that a "promoter of ATP release from erythrocytes, comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state" is the specified invention of claim 1 of this application, this authority finds that the common subject matter with claim 4, "a pharmaceutical composition comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state," lies in the "pharmaceutical composition comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state." However, as described in the document listed below, since drugs comprising carbon dioxide as an active ingredient that are capable of promoting ATP release from erythrocytes are already publicly known, this authority finds that a comparison with prior art shows that the novel main features of these two claims are not the same.

Furthermore, this authority finds no common technical issues in these two claims that have not been resolved before the filing date of this application.

Therefore, the subject matter of claims 4-6 of this application does not constitute one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 10-16:

This authority finds that the common subject matter of claim 10 of this application, "an inhibitor of ATP release from erythrocytes, comprising a substance capable of stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its R-state," and the above specified invention lies in "the control of ATP release through stabilization of the structure of hemoglobin in erythrocytes." However, as noted above, this feature is already publicly known.

Therefore, for the same reason as noted above, the subject matter of claims 10-16 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 19-33:

This authority finds that the subject matter of claim 19 of this application, "erythrocytes wherein the structure of hemoglobin has been stabilized in its T-state," and the subject matter of claims 25-33, "a pharmaceutical composition comprising such erythrocytes" are common to the above specified invention with respect to "stabilizing the structure of hemoglobin in erythrocytes in its T-state." However, as noted above, this feature is already publicly known.

Therefore, for the same reason as noted above, the subject matter of claims 19-33 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The same applies to claims 22-24.

Claims 34-38:

This authority finds that the novel main feature of the subject matter of claim 34 of this application, "an ATP assay method characterized by carrying out quantitative determination of ATP released from erythrocytes with dependence on oxygen concentration," is not the same as that of the above specified invention because it does not specify an ATP assay method wherein the ATP release promoter of the specified invention is used. Furthermore, this authority finds no common technical issues in these two claims that have not been resolved before the filing date of this application.

Supplemental Box

Continuation of: Box IV.

Therefore, the subject matter of claims 34-38 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 41-43:

Because in claim 41 the active ingredients contained therein are different from those of the specified invention, this authority finds that the only common matter between the subject matter of claim 41 of this application and the above specified invention lies in the application thereof, i.e., "the control of ATP release from erythrocytes." However, as noted above, this application is already publicly known.

Therefore, as noted above, the subject matter of claims 41-43 of this application does not constitute, together with claims 1-3 and 7, one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Reference: JAGGER, Justin E. et al., Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, p H2833-2839

Supplemental Box

Continuation of: Box V.

Novelty and Inventive Step:

Claims 1-7, 10-15, and 34

Document 1 states that carbon dioxide promotes the release of ATP from erythrocytes (page H2833, Abstract; Figures 2 and 3), and it describes the enzyme concentration-dependent quantitation of ATP released from erythrocytes (METHODS).

Therefore, based on the description in document 1, the inventions of claims 1-7, 10-15, and 34 of this application lack novelty and an inventive step.

Claims 1-7

Document 2 states that NO has a powerful vasodilating action (page 607, Abstract).

Document 3 states that adenosine has a powerful vasodilating action (page 41, Abstract).

Document 4 states that carbon dioxide has a powerful vasodilating action (page 907).

Document 5 states that bezafibrate has a hypotensive effect and blood flow correcting effect.

Therefore, based on the descriptions in documents 2-5, the inventions of claims 1-7 of this application lack novelty and an inventive step.

Claims 10-15 and 41-43

Document 6 states that glibenclamide, which is one type of sulfonylurea, inhibits the release of ATP from erythrocytes (page H1726, Abstract).

Therefore, based on the description in document 6, the inventions of claims 10-15 and 41-43 of this application are refuted of novelty and an inventive step.

Claims 10-16

Document 7 states that carbon monoxide has a vasoconstrictive action (page R1087, Abstract).

Therefore, based on the description in document 7, the inventions of claims 10-16 of this application lack novelty and an inventive step.

Claims 10-16 and 41-43

Document 8 states that glibenclamide has the function of causing vessels to constrict (page 2071, Abstract).

Therefore, based on the description in document 8, the inventions of claims 10-16 and 41-43 are refuted of novelty and an inventive step.

Supplemental Box

Continuation of: Box V.

Claims 19-21 and 25

Document 9 describes erythrocytes that have been treated with NO (Claims 1-21; Example 4).

Therefore, based on the description in document 9, the inventions of claims 19-21 and 25 of this application are refuted of novelty and an inventive step.

Claims 22-24 and 31

Document 10 describes erythrocytes that have been treated with carbon monoxide (Claims 1-5).

Therefore, based on the description in document 10, the inventions of claims 22-24 and 31 lack novelty and an inventive step.

Claims 25-29

Document 11 describes an agent for the treatment of myocardial infarction and thrombosis having erythrocytes containing nitrosated hemoglobin as an active ingredient (Claims 30 and 31).

Therefore, based on the description in document 11, the inventions of claims 25-29 lack novelty and an inventive step.

Claims 30-33

As described in document 11, nitrosated hemoglobin can be used to treat myocardial infarction, but document 11 does not describe or suggest that such hemoglobin is useful for the treatment of acidosis.

In addition, document 12 describes the use of sulfonylurea in the treatment of septic shock.

However, document 12 does not describe or suggest the use of erythrocytes treated with sulfonylurea and the like in the treatment of septic shock.

Therefore, the inventions of claims 30-33 of this application are not refuted of novelty and an inventive step with respect to the documents listed in the international search report.

# PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference P03-0181PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See item 4 below
International application No. PCT/JP2004/009675	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 01 July 2004 (01.07.2004)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 29 January 2004 (29.01.2004)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant KEIO UNIVERSITY		

1.	This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).																								
2.	<p>This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.</p> <p>In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.</p>																								
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%; text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="width: 20%;">Box No. I</td> <td style="width: 70%;">Basis of the report</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. I	Basis of the report	<input type="checkbox"/>	Box No. II	Priority	<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. IV	Lack of unity of invention	<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	<input type="checkbox"/>	Box No. VI	Certain documents cited	<input type="checkbox"/>	Box No. VII	Certain defects in the international application	<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. VIII	Certain observations on the international application
<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. I	Basis of the report																							
<input type="checkbox"/>	Box No. II	Priority																							
<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																							
<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. IV	Lack of unity of invention																							
<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																							
<input type="checkbox"/>	Box No. VI	Certain documents cited																							
<input type="checkbox"/>	Box No. VII	Certain defects in the international application																							
<input checked="" type="checkbox"/>	Box No. VIII	Certain observations on the international application																							
4.	The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).																								

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Date of issuance of this report 31 July 2006 (31.07.2006)
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">Masashi Honda</div> e-mail: pt08@wipo.int

## 特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

REC'D 14 OCT 2004

WIPO

PCT

出願人代理人

小林 浩

様

あて名

〒 104-0028

東京都中央区八重洲2丁目8番7号

福岡ビル9階

阿部・井窪・片山法律特許事務所

PCT  
国際調査機関の見解書  
(法施行規則第40条の2)  
[PCT規則43の2.1]発送日  
(日.月.年)

12.10.2004

出願人又は代理人  
の書類記号

P03-0181PCT

今後の手続きについては、下記2を参照すること。

国際出願番号

PCT/J P 2004/009675

国際出願日

(日.月.年)

01.07.2004

優先日

(日.月.年)

29.01.2004

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl' A61K45/00, 31/195, 33/00, A61P9/08, 9/00, 9/10, 25/00

出願人 (氏名又は名称)

学校法人慶應義塾

## 1. この見解書は次の内容を含む。

☒ 第I欄 見解の基礎☐ 第II欄 優先権☒ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成☒ 第IV欄 発明の単一性の欠如☒ 第V欄 PCT規則43の2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明☐ 第VI欄 ある種の引用文献☐ 第VII欄 国際出願の不備☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見

## 2. 今後の手続き

国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がPCT規則66.1の2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。

この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式PCT/ISA/220を送付した日から3月又は優先日から22月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。

さらなる選択肢は、様式PCT/ISA/220を参照すること。

## 3. さらなる詳細は、様式PCT/ISA/220の備考を参照すること。

見解書を作成した日

24.09.2004

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

様式PCT/ISA/237 (表紙) (2004年1月)

## 第 I 欄 見解の基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

- ☐ この見解書は、                     語による翻訳文を基礎として作成した。  
それは国際調査のために提出された PCT 規則 12.3 及び 23.1(b) にいう翻訳文の言語である。

2. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に不可欠なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

- a. タイプ ☐ 配列表  
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面  
☐ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる  
☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

3. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

4. 補足意見：



## 第Ⅲ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲8, 9, 17, 18, 35-40は、治療による人体の処置方法に関するものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40 について、国際調査報告が作成されていない。

☐ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

☐ 提出されていない。

☐ 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

☐ 提出されていない。

☐ 所定の基準を満たしていない。

☐ コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附属書Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

☐ 提出されていない。

☐ 所定の技術的な要件を満たしていない。

☐ 詳細については補充欄を参照すること。

## 第IV欄 発明の単一性の欠如

1. 追加手数料納付の求め（様式PCT/ISA/206）に対して、出願人は、

- ☒ 追加手数料を納付した。  
☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。  
☐ 追加手数料の納付はなかった。

2. ☐ 国際調査機関は、発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際調査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。  
☒ 以下の理由により満足しない。  
別紙参照

4. したがって、国際出願の次の部分について、この見解書を作成した。

- ☐ すべての部分  
☒ 請求の範囲 1-7, 10-16, 19-34, 41-43 に関する部分

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	30, 32, 33	有
	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	30, 32, 33	有
	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-34, 41-43	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

- 文献1: JAGGER, Justin E. *et al*, Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, ppH2833-H2839
- 文献2: 平田恭信, 高血圧とNO, 医学のあゆみ, 2003, Vol. 204, No. 9, pp607-610
- 文献3: FULLERTON, Davis A. *et al*, Adenosine is a selective pulmonary vasodilator in cardiac surgical patients, CHEST, 1996, Vol. 109, pp41-46
- 文献4: DIJI, A *et al*, The local effect of carbon dioxide on human blood vessels, Am. Heart J., 1960, Vol. 60, pp907-914
- 文献5: AGRAWAL B. *et al*, Acute effects of bezafibrate on blood pressure and renal haemodynamics in SHR and WKY rats, Nephrol. Dial. Transplant, 1998, Vol. 13, pp333-339
- 文献6: SPRAGUE, Randy S *et al*, Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity, American Journal of Physiology, 1998, Vol. 275, ppH1726-H1732
- 文献7: KOZMA, Fruzsina *et al*, Contribution of endogenous carbon monoxide to redulation of diameter in resistance vessels, Am. J. Physiol., 1999, Vol. 276, ppR1087-1094
- 文献8: LANDRY, Donald W. *et al*, The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog, J. Clin. Invest., 1992, Vol. 89, pp2071-2074
- 文献9: JP 2001-507375 A(ヨネタニ タカシ)2001.06.05 & WO 99/01146 A1
- 文献10: JP 6-16693 A(財団法人生産開発科学研究所)1994.01.25(ファミリーなし)
- 文献11: JP 11-512436 A(デューク ユニバーシティ メディカル センター) 1999.10.26 & WO 97/10265 A1

## 第Ⅷ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

## 請求の範囲41-43について

本願の請求の範囲41-43には、「バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質」と記載されているが、本願の明細書中に当該物質として具体的に記載されているのはスルフォニルウレアのみである。また、本願出願時において、スルフォニルウレア以外の「バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質」がどのようなものであるのか当業者に明らかであったとも認められない。

してみれば、本願の請求の範囲41-43に係る発明は、明細書による十分な裏付けがなされていない。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

新規性、進歩性について

請求の範囲1-7, 10-15, 34について

文献1には、二酸化炭素が赤血球からのATPの遊離を促進することが記載され（第H2 833頁Abstract, Fig. 2, Fig. 3）、赤血球から遊離されたATPを酵素濃度依存性に定量することも記載されている（METHODS）。

したがって、本願の請求の範囲1-7, 10-15, 34に係る発明は、文献1より新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲1-7について

文献2には、NOに強力な血管拡張作用があることが記載されている（第607頁Abstract）。

文献3には、アデノシンに血管拡張作用があることが記載されている（第41頁Abstract）。

文献4には、二酸化炭素に血管拡張作用があることが記載されている（第907頁）。

文献5には、ベザフィブラートに降圧作用及び血流改善作用があることが記載されている（第331頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲1-7に係る発明は、文献2-5から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲10-15, 41-43について

文献6には、スルフォニルウレアの1種であるグリベンクラミドが赤血球からのATP遊離を阻害することが記載されている（第H1726頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-15, 41-43に係る発明は、文献6から新規性及び進歩性が否定される。

請求の範囲10-16について

文献7には、一酸化炭素に血管収縮作用があることが記載されている（第R1087頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-16に係る発明は、文献7から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲10-16, 41-43について

文献8には、グリベンクラミドが血管を収縮させる機能を有することが記載されている（第2071頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-16, 41-43に係る発明は、文献8より新規性及び進歩性が否定される。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

請求の範囲19-21, 25について

文献9には、一酸化窒素で処理された赤血球が記載されている（請求項1-21、実施例4）。

したがって、本願の請求の範囲19-21, 25に係る発明は、文献9から新規性及び進歩性が否定される。

請求の範囲22-24, 31について

文献10には、一酸化炭素で処理された赤血球が記載されている（請求項1-5）。

したがって、本願の請求の範囲22-24, 31に係る発明は、文献10から新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲25-29について

文献11には、ニトロソ化ヘモグロビンを含む赤血球を有効成分とする心筋梗塞や血栓症の治療剤が記載されている（請求項30, 31）。

したがって、本願の請求の範囲25-29に係る発明は、文献11から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲30-33について

文献11には上記のとおりニトロソ化ヘモグロビンが心筋梗塞を治療できることが記載されているが、当該ヘモグロビンがアシドーシスの治療にも有用であることは記載も示唆もなされていない。

また、文献12には、スルフォニルウレアが敗血症ショックの治療に用いられることが記載されている。

しかしながら、スルフォニルウレア等で処理された赤血球が敗血症ショックの治療に用いられることは記載も示唆もされていない。

したがって、本願の請求の範囲30-33に係る発明は、国際調査報告に挙げられたいずれの文献によっても新規性及び進歩性は否定されない。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 IV 欄の続き

## 請求の範囲4-6について

本願の請求の範囲1に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離促進剤」を特定発明と見ると、請求の範囲4に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物」との共通部は「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む医薬組成物」であると認められるが、下記文献に記載のとおり、二酸化炭素を有効成分とし、赤血球からのATPの遊離を促進する医薬は公知であるため、両者は先行技術との対比において新規な主要部が同一であるとは認められない。

また両者がこの出願時まで未解決であった技術上の共通の課題を有するとも認められない。

したがって、本願の請求の範囲4-6に係る発明は、請求の範囲に係る発明と、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲10-16について

本願の請求の範囲10に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をR状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離抑制剤」と上記特定発明との共通部は「赤血球のヘモグロビンの構造を安定化させ、ATP遊離を制御する」ことであると認められるが、上記のとおり当該構成は公知である。

したがって、同様の理由により、本願の請求の範囲10-16に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲19-33について

本願の請求の範囲19に係る発明「ヘモグロビンの構造がT状態で安定化された赤血球」及び請求の範囲25-33に係るそれら赤血球を含む医薬組成物と上記特定発明は、「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる」点で共通しているが、上記のとおり当該構成は公知であるため、同様の理由により、本願の請求の範囲19-33に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、請求の範囲22-24についても同様である。

## 請求の範囲34-38について

本願の請求の範囲34に係る発明「赤血球から遊離されたATP量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とするATPの測定方法」は、上記特定発明であるATP遊離促進剤を用いるものに特定されていないため、特定発明と新規な主要部が同一であるとは認められない。また、両者が本願出願日まで未解決であった共通の技術的課題を有するとも認められない。

したがって、本願の請求の範囲34-38に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲41-43について

本願の請求の範囲41に係る発明と上記特定発明は、含有する有効成分が相違しているため、用途である「赤血球からのATPの遊離を制御する」点でのみ共通していると認められるが、上記のとおり、当該用途は公知である。

したがって、先に検討したとおり、本願の請求の範囲41-43に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

文献: JAGGER, Justin E. *et al*, Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, ppH2833-2839

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

REC'D 14 OCT 2004

WIPO

PCT

出願人代理人

小林 浩

様

あて名

〒 104-0028

東京都中央区八重洲2丁目8番7号

福岡ビル9階

阿部・井窪・片山法律特許事務所

PCT  
国際調査機関の見解書  
(法施行規則第40条の2)  
[PCT規則43の2.1]発送日  
(日.月.年)

12.10.2004

出願人又は代理人  
の書類記号

P03-0181PCT

今後の手続きについては、下記2を参照すること。

国際出願番号

PCT/J P 2004/009675

国際出願日

(日.月.年) 01.07.2004

優先日

(日.月.年) 29.01.2004

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/195, 33/00, A61P9/08, 9/00, 9/10, 25/00

出願人 (氏名又は名称)

学校法人慶應義塾

## 1. この見解書は次の内容を含む。

- ☒ 第I欄 見解の基礎
- ☐ 第II欄 優先権
- ☒ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
- ☒ 第IV欄 発明の単一性の欠如
- ☒ 第V欄 PCT規則43の2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第VI欄 ある種の引用文献
- ☐ 第VII欄 国際出願の不備
- ☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見

## 2. 今後の手続き

国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がPCT規則66.1の2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。

この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式PCT/ISA/220を送付した日から3月又は優先日から22月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。

さらなる選択肢は、様式PCT/ISA/220を参照すること。

## 3. さらなる詳細は、様式PCT/ISA/220の備考を参照すること。

見解書を作成した日

24.09.2004

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

様式PCT/ISA/237 (表紙) (2004年1月)



## 第 I 欄 見解の基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

- ☐ この見解書は、\_\_\_\_\_ 語による翻訳文を基礎として作成した。  
それは国際調査のために提出された PCT 規則 12.3 及び 23.1(b) にいう翻訳文の言語である。

2. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に不可欠なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

- a. タイプ ☐ 配列表  
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面  
☐ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる  
☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

3. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

4. 補足意見：

## 第Ⅲ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に關して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40

理由:

☒ この国際出願又は請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲8, 9, 17, 18, 35-40は、治療による人体の処置方法に関するものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 8, 9, 17, 18, 35-40 について、国際調査報告が作成されていない。

☐ ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

- ☐ 提出されていない。  
☐ 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

- ☐ 提出されていない。  
☐ 所定の基準を満たしていない。

☐ コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附属書Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

- ☐ 提出されていない。  
☐ 所定の技術的な要件を満たしていない。

☐ 詳細については補充欄を参照すること。

## 第IV欄 発明の単一性の欠如

1. 追加手数料納付の求め（様式PCT/ISA/206）に対して、出願人は、

- ☒ 追加手数料を納付した。  
☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。  
☐ 追加手数料の納付はなかった。

2. ☐ 国際調査機関は、発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際調査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。  
☒ 以下の理由により満足しない。  
別紙参照

4. したがって、国際出願の次の部分について、この見解書を作成した。

- ☐ すべての部分  
☒ 請求の範囲 1-7, 10-16, 19-34, 41-43 に関する部分

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	30, 32, 33	有 無
	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	
進歩性 (IS)	請求の範囲	30, 32, 33	有 無
	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-29, 31, 34, 41-43	
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7, 10-16, 19-34, 41-43	有 無
	請求の範囲		

2. 文献及び説明

- 文献1: JAGGER, Justin E. *et al*, Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, ppH2833-H2839
- 文献2: 平田恭信, 高血圧とNO, 医学のあゆみ, 2003, Vol. 204, No. 9, pp607-610
- 文献3: FULLERTON, Davis A. *et al*, Adenosine is a selective pulmonary vasodilator in cardiac surgical patients, CHEST, 1996, Vol. 109, pp41-46
- 文献4: DIJI, A *et al*, The local effect of carbon dioxide on human blood vessels, Am. Heart J., 1960, Vol. 60, pp907-914
- 文献5: AGRAWAL B. *et al*, Acute effects of bezafibrate on blood pressure and renal haemodynamics in SHR and WKY rats, Nephrol. Dial. Transplant, 1998, Vol. 13, pp333-339
- 文献6: SPRAGUE, Randy S *et al*, Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity, American Journal of Physiology, 1998, Vol. 275, ppH1726-H1732
- 文献7: KOZMA, Fruzsina *et al*, Contribution of endogenous carbon monoxide to redulation of diameter in resistance vessels, Am. J. Physiol., 1999, Vol. 276, ppR1087-1094
- 文献8: LANDRY, Donald W. *et al*, The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog, J. Clin. Invest. 1992, Vol. 89, pp2071-2074
- 文献9: JP 2001-507375 A(ヨネタニ タカシ)2001.06.05 & WO 99/01146 A1
- 文献10: JP 6-16693 A(財団法人生産開発科学研究所)1994.01.25(ファミリーなし)
- 文献11: JP 11-512436 A(デューク ユニバーシティ メディカル センター) 1999.10.26 & WO 97/10265 A1

## 第Ⅷ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

## 請求の範囲41-43について

本願の請求の範囲41-43には、「バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質」と記載されているが、本願の明細書中に当該物質として具体的に記載されているのはスルフォニルウレアのみである。また、本願出願時において、スルフォニルウレア以外の「バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質」がどのようなものであるのか当業者に明らかであったとも認められない。

してみれば、本願の請求の範囲41-43に係る発明は、明細書による十分な裏付けがなされていない。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

新規性、進歩性について

請求の範囲1-7, 10-15, 34について

文献1には、二酸化炭素が赤血球からのATPの遊離を促進することが記載され（第H2 833頁Abstract, Fig. 2, Fig. 3）、赤血球から遊離されたATPを酵素濃度依存性に定量することも記載されている（METHODS）。

したがって、本願の請求の範囲1-7, 10-15, 34に係る発明は、文献1より新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲1-7について

文献2には、NOに強力な血管拡張作用があることが記載されている（第607頁Abstract）。

文献3には、アデノシンに血管拡張作用があることが記載されている（第41頁Abstract）。

文献4には、二酸化炭素に血管拡張作用があることが記載されている（第907頁）。

文献5には、ベザフィブラートに降圧作用及び血流改善作用があることが記載されている（第331頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲1-7に係る発明は、文献2-5から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲10-15, 41-43について

文献6には、スルフォニルウレアの1種であるグリベンクラミドが赤血球からのATP遊離を阻害することが記載されている（第H1726頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-15, 41-43に係る発明は、文献6から新規性及び進歩性が否定される。

請求の範囲10-16について

文献7には、一酸化炭素に血管収縮作用があることが記載されている（第R1087頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-16に係る発明は、文献7から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲10-16, 41-43について

文献8には、グリベンクラミドが血管を収縮させる機能を有することが記載されている（第2071頁Abstract）。

したがって、本願の請求の範囲10-16, 41-43に係る発明は、文献8より新規性及び進歩性が否定される。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

請求の範囲19-21, 25について

文献9には、一酸化窒素で処理された赤血球が記載されている（請求項1-21、実施例4）。

したがって、本願の請求の範囲19-21, 25に係る発明は、文献9から新規性及び進歩性が否定される。

請求の範囲22-24, 31について

文献10には、一酸化炭素で処理された赤血球が記載されている（請求項1-5）。

したがって、本願の請求の範囲22-24, 31に係る発明は、文献10から新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲25-29について

文献11には、ニトロソ化ヘモグロビンを含む赤血球を有効成分とする心筋梗塞や血栓症の治療剤が記載されている（請求項30, 31）。

したがって、本願の請求の範囲25-29に係る発明は、文献11から新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲30-33について

文献11には上記のとおりニトロソ化ヘモグロビンが心筋梗塞を治療できることが記載されているが、当該ヘモグロビンがアシドーシスの治療にも有用であることは記載も示唆もなされていない。

また、文献12には、スルフォニルウレアが敗血症ショックの治療に用いられることが記載されている。

しかしながら、スルフォニルウレア等で処理された赤血球が敗血症ショックの治療に用いられることは記載も示唆もされていない。

したがって、本願の請求の範囲30-33に係る発明は、国際調査報告に挙げられたいずれの文献によっても新規性及び進歩性は否定されない。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 IV 欄の続き

## 請求の範囲4-6について

本願の請求の範囲1に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離促進剤」を特定発明と見ると、請求の範囲4に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物」との共通部は「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる物質を含む医薬組成物」であると認められるが、下記文献に記載のとおり、二酸化炭素を有効成分とし、赤血球からのATPの遊離を促進する医薬は公知であるため、両者は先行技術との対比において新規な主要部が同一であるとは認められない。

また両者がこの出願時まで未解決であった技術上の共通の課題を有するとも認められない。

したがって、本願の請求の範囲4-6に係る発明は、請求の範囲に係る発明と、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲10-16について

本願の請求の範囲10に係る発明「赤血球のヘモグロビンの構造をR状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離抑制剤」と上記特定発明との共通部は「赤血球のヘモグロビンの構造を安定化させ、ATP遊離を制御する」ことであると認められるが、上記のとおり当該構成は公知である。

したがって、同様の理由により、本願の請求の範囲10-16に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲19-33について

本願の請求の範囲19に係る発明「ヘモグロビンの構造がT状態で安定化された赤血球」及び請求の範囲25-33に係るそれら赤血球を含む医薬組成物と上記特定発明は、「赤血球のヘモグロビンの構造をT状態で安定化させる」点で共通しているが、上記のとおり当該構成は公知であるため、同様の理由により、本願の請求の範囲19-33に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、請求の範囲22-24についても同様である。

## 請求の範囲34-38について

本願の請求の範囲34に係る発明「赤血球から遊離されたATP量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とするATPの測定方法」は、上記特定発明であるATP遊離促進剤を用いるものに特定されていないため、特定発明と新規な主要部が同一であるとは認められない。また、両者が本願出願日まで未解決であった共通の技術的課題を有するとも認められない。

したがって、本願の請求の範囲34-38に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

## 請求の範囲41-43について

本願の請求の範囲41に係る発明と上記特定発明は、含有する有効成分が相違しているため、用途である「赤血球からのATPの遊離を制御する」点のみ共通していると認められるが、上記のとおり、当該用途は公知である。

したがって、先に検討したとおり、本願の請求の範囲41-43に係る発明は、請求の範囲1-3, 7に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

文献: JAGGER, Justin E. *et al*, Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, Vol. 280, ppH2833-2839



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

01.7.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 4 年   1 月 2 9 日  
Date of Application:

REC'D. 19 AUG 2004

出 願 番 号      特 願 2 0 0 4 - 0 2 2 3 0 5  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 4 - 0 2 2 3 0 5 ]

PCT

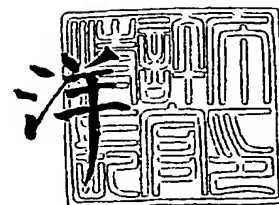
出 願 人      学 校 法 人 慶 應 義 塾  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   8 月   6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 7 0 0 7 6

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0181  
【提出日】 平成16年 1月29日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 35/18  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内  
    【氏名】 末松 誠  
【特許出願人】  
    【識別番号】 899000079  
    【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾  
【代理人】  
    【識別番号】 100092783  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 浩  
    【電話番号】 03-3273-2611  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100095360  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 片山 英二  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100093676  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 純子  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100120134  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 大森 規雄  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 157061  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離促進剤。

## 【請求項 2】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質が、ベザフィブラート、一酸化窒素及び二酸化炭素からなる群から選択される少なくとも1つである請求項 1 記載の促進剤。

## 【請求項 3】

100 mmHg以下の酸素分圧下において細胞外にATPを遊離させることができる請求項 1 記載の促進剤。

## 【請求項 4】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

## 【請求項 5】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質が、ベザフィブラート又は一酸化窒素である請求項 4 記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPを細胞外に遊離させることができる請求項 4 記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

血管拡張薬又は血流改善薬である請求項 4 記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態に安定化することを特徴とする、赤血球からATPを遊離させる方法。

## 【請求項 9】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPを遊離させることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離抑制剤。

## 【請求項 11】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質が、一酸化炭素である請求項 10 記載の抑制剤。

## 【請求項 12】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPの遊離を抑制することができる請求項 10 記載の抑制剤。

## 【請求項 13】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

## 【請求項 14】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質が、一酸化炭素である請求項 13 記載の医薬組成物。

## 【請求項 15】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPの遊離を抑制することができる請求項 13 記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

血管収縮薬又は血流制御薬である請求項 13 記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させることを特徴とする、赤血球からのATPの遊離を抑制する方法。

## 【請求項 18】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPの遊離を抑制することを特徴とする請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

ヘモグロビンの構造がT-状態で安定化された赤血球。

【請求項 20】

ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素及び水素イオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質で処理された請求項 19 記載の赤血球。

【請求項 21】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPを遊離することができる請求項 19 記載の赤血球。

【請求項 22】

ヘモグロビンの構造がR-状態で安定化された赤血球。

【請求項 23】

一酸化炭素で処理された請求項 22 記載の赤血球。

【請求項 24】

100 mmHg以下の酸素分圧下においてATPの遊離を抑制することができる請求項 22 記載の赤血球。

【請求項 25】

請求項 19～21 のいずれか 1 項に記載の赤血球を含む医薬組成物。

【請求項 26】

虚血性疾患を治療するための請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 27】

虚血性疾患が、出血性ショック、敗血症性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、及び糖尿病による血管障害からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 26 記載の医薬組成物。

【請求項 28】

アシドーシスを治療するための請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 29】

請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の赤血球を含む医薬組成物。

【請求項 30】

虚血・再灌流症候群を治療するための請求項 29 記載の医薬組成物。

【請求項 31】

虚血・再灌流症候群が、ショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建からなる群から選択される、少なくとも一つの原因により起こるものである請求項 30 記載の医薬組成物。

【請求項 32】

赤血球から遊離されたATP量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とするATPの測定方法。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】赤血球機能修飾物質

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態又はR-状態に安定化する物質を含む、赤血球からのATP遊離調節剤、並びに前記物質を含む医薬組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

疾患の治療及び臨床検査の場において、薬物を効果的かつ選択的に標的組織に送達させるために、特定の組織への薬物送達の方法、すなわちドラッグデリバリーシステムの開発が望まれている。ドラッグデリバリーシステムを確立させるための重要な要素の1つは、薬物の運搬体である。これまでに、薬物の運搬体として機能する物質については多数の研究がなされており、中でも赤血球を運搬体として使用するための技術が開発されている（特許文献1及び特許文献2）。上記公報には、赤血球がその内部又は表面に薬物又は酸素を結合し、運搬するための担体として機能していることが記載されている。

## 【0003】

しかしながら、赤血球は、標的組織への薬物や酸素の運搬体としてのみ認識されており、赤血球自身が有する生理機能を人為的に制御してこれを臨床に応用する技術は知られておらず、赤血球の有する酸素放出能や血管拡張作用を、標的部位において特異的に発揮させる方法は見出されていなかった。

## 【0004】

一方、赤血球に、血中酸素分圧の低下、pHの低下、又は機械的変形などのさまざまな刺激を与えるとATPを遊離することが知られている（非特許文献1）。そして、赤血球から遊離したATPは、内皮細胞上の特異的受容体に作用し、一酸化窒素(NO)とプロスタサイクリンの血管内皮での合成と遊離を促進する。この両者は、血管拡張反応に深く関わるということが知られている。

## 【0005】

しかしながら、赤血球からのATP遊離の詳細な分子機構とその酸素濃度依存性の詳細は明らかではなく、そのためATPの遊離現象を具体的にどのように病態の制御に応用すればよいかは依然として不明確であった。

【特許文献1】特表2003-522140号公報

【特許文献2】特表2001-512480号公報

【非特許文献1】Sprague, R. S. et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 281: C1158-C1164, 2001

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

ATPを遊離する赤血球、ATPを遊離させる薬物を含む赤血球、及びATPを遊離する赤血球を含む医薬組成物を提供することを目的とする。さらに、酸素濃度依存性ATP遊離量を赤血球で定量的に測定する方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者は、上記課題を解決するため誠意研究を行った結果、T型又はR型にヘモグロビンの構造を安定化することにより、酸素分圧に関係なく、あるいは望みの酸素濃度でATPの遊離を制御し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0008】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態に安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離促進剤。

## 【0009】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質としては、例えばベザフィブラート、一酸化窒素及び二酸化炭素からなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。上記ATPの遊離は、100 mmHg以下の酸素分圧下において行うことができる。

(2) 赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

【0010】

赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態に安定化させる物質、及びATPを遊離させる酸素分圧は、(1)に示したものと同様である。本発明の医薬組成物は、例えば血管拡張薬又は血流改善薬として使用される。

(3) 赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態に安定化することを特徴とする、赤血球からATPを遊離させる方法。

【0011】

ATPの遊離は、酸素分圧は100 mmHg以下において行うことができる。

(4) 赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態に安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離抑制剤。

【0012】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質としては、一酸化炭素が挙げられる。また、ATPの遊離を抑制は、100 mmHg以下の酸素分圧下において行うことができる。

(5) 赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

【0013】

赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質、及びATPの遊離を抑制する酸素分圧は、上記(4)に示したものと同様である。この場合、本発明の医薬組成物は、例えば血管収縮薬、血流制御薬又は血管拡張阻害剤として使用することができる。

(6) 赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態に安定化させることを特徴とする、赤血球からのATPの遊離を抑制する方法。

【0014】

ATPの遊離の抑制は、100 mmHg以下の酸素分圧下において行うことができる。

(7) ヘモグロビンの構造がT-状態で安定化された赤血球。

【0015】

この場合、本発明の赤血球としては、ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素及び水素イオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質で処理された赤血球が挙げられる。また、ATPの遊離は、100 mmHg以下の酸素分圧下において行うことができる。

(8) ヘモグロビンの構造がR-状態で安定化された赤血球。

【0016】

この場合、本発明の赤血球としては、一酸化炭素で処理された赤血球が挙げられる。

【0017】

ATPの遊離の抑制は、100 mmHg以下の酸素分圧下において行うことができる。

(9) 前記(7)記載の赤血球を含む医薬組成物。

【0018】

この場合、本発明の医薬組成物は、虚血性疾患（例えば出血性ショック、敗血症性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、及び糖尿病による血管障害からなる群から選択される少なくとも1つ）又はアシドーシスを治療するために使用することができる。

(10) 前記(8)記載の赤血球を含む医薬組成物。

【0019】

この場合、本発明の医薬組成物は虚血・再灌流症候群（例えばショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建からなる群から選択される、少なくとも一つの原因により起こるもの）を治療するために使用することができる。

(11) 赤血球から遊離されたATP量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とするATPの測定方法。

## 【発明の効果】

## 【0020】

本発明により、赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離促進剤、及び赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からのATP遊離抑制剤が提供される。

## 【0021】

ヘモグロビンの構造をT-状態に安定化させると、高酸素分圧状態でも赤血球からATPを遊離させることができる。一方、ヘモグロビンの構造をR-状態に安定化させると、低酸素分圧状態でも赤血球からのATP放出を抑制することができる。従って、本発明のATP遊離促進剤は血管拡張薬又は血流改善薬として、また、本発明のATP遊離抑制剤は血管収縮薬、血流制御薬、血管拡張阻害薬又は血管過拡張を伴う敗血症ショックの治療薬として有用である。

## 【0022】

さらに、ヘモグロビンの構造がT-状態に安定化された赤血球は、ATPを遊離して血管を拡張することができるため、血流を増加させることが可能である。一方、ヘモグロビンの構造がR-状態に安定化された赤血球は、敗血症ショックなどで末梢血管が過拡張をおこした病態で投与できる赤血球製剤として有用であり、また、ATPの遊離を抑制して血小板の活性化を抑制するため、血栓を防止することが可能である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0023】

以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0024】

組織が低酸素状態になると赤血球からアデノシン3リン酸(ATP)が放出され、放出されたATPは、血管内皮細胞表面に発現する特異的受容体を介してカルシウム濃度を上昇させ、一酸化窒素(NO)及びプロスタサイクリンの合成と遊離を促進する。このことは、このNOとプロスタサイクリンにより血管拡張作用が生じることを意味している。

## 【0025】

一方、血漿中に出たATPはアデノシン2リン酸(ADP)に分解され、血小板を活性化する。これは止血が生じることを意味している。

## 【0026】

このように、赤血球からATPが遊離されることは、生体内の生理機能にとって極めて重要である。しかしながら、その酸素濃度依存性と生理機能の機序との関係はこれまで明らかにされていなかった。また、赤血球が低酸素分圧部位に到達したときに、血管拡張物質であるATPを放出して病巣に到達する能力を持っていることを分子論的に証明した研究はなかった。

## 【0027】

そこで本発明者は、赤血球からのATPの遊離が低酸素分圧下でどのように起こるかという点に着目して鋭意研究を行った。

## 1. ATP遊離とヘモグロビンアロステリーとの関係

赤血球からのATP遊離パターンは、酸素分圧との関係で酸素解離曲線と同様のシグモイド曲線を描いた。ここで、酸素解離曲線とは、酸素分圧に対する、酸素と結合したヘモグロビンの割合を示す曲線を意味する。このATP遊離パターンは赤血球中のヘモグロビン(Hb)アロステリーに依存しており、ATPの遊離パターンはHbのシグモイド曲線のパターンと類似していた。そこで、本発明者は、赤血球ATP放出反応における酸素依存性は、ヘモグロビンが酸素濃度を感知してこの現象を引き起こすためであると考えた。そして、ヘモグロビンの構造をT型又はR型構造に安定化させて赤血球からのATP遊離を測定した。その結果、R型はATP放出を抑制し、T型はATP放出を活性化し、前記考察が証明された。

## 【0028】

ヘモグロビンは酸素の運搬体として機能する分子量64,500のタンパク質である。ヘモグロビンの酸素との結合親和性は、ヘモグロビンの構造と関係する。つまり、ヘモグロビンは低酸素分圧下ではT型構造（「T-状態」という）を、また高酸素分圧下ではR型構造（「R-状態」という）をとる。ここで「T-状態」とは、ヘム5配位であって酸素に対し高親和性の構造を意味する。また、「R-状態」とは、ヘム6配位であって酸素に対し低親和性の構造を意味する。

#### 【0029】

ヘモグロビンをT-又はR-状態に安定化させる薬物は、いくつか見出されている。そこで、これらの薬物を用いてヘモグロビンアロステリーをT-状態又はR-状態に安定化したときのATP遊離パターンを調べるため、ヘモグロビンをT-状態に安定化させることが知られているNO誘導体を用いて検討を行った(Yonetani, T. et al., J. Biol. Chem., 273(32), 20323-20333(1998))。

#### 【0030】

このNO誘導体を酸素非存在下でヘモグロビンに添加すると、赤血球は酸素分圧にかかわらず、ATPを一定して放出した。また、ヘモグロビンをR-状態に安定化させることが知られている一酸化炭素(CO)を用いて同様に測定すると、赤血球は酸素分圧にかかわらず、ATPを殆ど遊離しなかった。従って、ヘモグロビンの構造をT-状態又はR-状態に安定化すると、酸素分圧とは無関係にATP遊離を調節し得ることを見出した。このことは、血中の酸素分圧の低下によりヘモグロビンの構造がT-状態に移行するとき、又はヘモグロビンの構造をT-状態に安定化させたときは、血管拡張作用を有するATPを効果的に赤血球から遊離させることができることを意味する。また、血中の酸素分圧の増加によりヘモグロビンの構造がR-状態に移行するとき、又はヘモグロビンの構造をR-状態に安定化したときは、赤血球からのATPの遊離を抑制させることができることを意味する。

#### 【0031】

図1に示すように、ヒト赤血球は酸素分圧が低下するとATPを細胞外に放出する。その能力は、酸素分圧が50~70 mmHgを境界(変曲点)とするシグモイドカーブを示すことから、本発明者は酸素濃度のセンシングをヘモグロビンが行っていることを想定した。そして、ヘモグロビンの構造をいわゆるR-状態(ヘム6配位)に安定化するCOで赤血球を飽和させると、この能力は完全に消失した。一方、ヘモグロビンの構造をいわゆるT-状態(ヘム5配位)に安定化するベザフィブラート(bezafibrate)(100  $\mu$ M 30分処理)は正常酸素濃度でも多くのATPを放出する赤血球に変化させた。

#### 【0032】

さらに図2に示すように、T-状態に安定化するNOを酸素非存在下でヘモグロビン0.5当量で添加すると、赤血球は酸素濃度に関わらずATPを一定して放出するようになった（「 $\alpha$  NO-Hb」のグラフ）。

#### 【0033】

従って、ヘモグロビンをT-状態に安定化させた赤血球は、虚血・再酸素化障害を軽減する効果を示すと考えられる。虚血・再還流が生じ得る臓器又は組織としては、例えば心臓、肝臓、脳、肺、腎臓、血管、骨格筋、脾臓、胃、小腸、大腸などを挙げることができるがこれに限定されるものではない。特に、肝臓における虚血・再還流障害において、赤血球は胆汁分泌の回復を劇的に改善させる効果を発揮する。このことは、ラットの全身血液体積の40%を脱血させ、15分後に同量のヘモグロビンを赤血球又はT-状態安定化赤血球で戻したときの肝臓微小循環動態を検討することによって明らかとなった(後述)。つまり、T-状態安定化赤血球を戻す時に得られる効果が、正常の赤血球で得られる効果よりも、有効循環類洞密度(functional sinusoidal density(FSD))、アシドーシスの改善、胆汁分泌の回復率で上回ることが示された(図3)。

#### 【0034】

また、献血血液は一般に4℃で保存されるが、このような低温保存下ではそれだけでヘモグロビンはR-状態となる。さらに、低温保存時に一酸化炭素ヘモグロビン(CO-Hb)にすると、ATPの放出を抑制して、赤血球のエネルギーを温存することもできる。このようなR-



状態にある赤血球にT-状態安定化剤を添加するとATPの放出を活性化した。つまり、R状態にある赤血球又は一酸化炭素飽和赤血球においてもATP放出回復効果が認められた。さらにまた、上記の肝臓における虚血・再還流障害において、一酸化飽和赤血球によって、有効循環類洞密度をショック前の90%にまで回復することが示された(図3)。このことは、COの末梢組織に運ぶ担体として赤血球を使用できることを意味する。

#### 【0035】

上記のことから、ヘモグロビンのR-T transitionを調節する薬剤は、赤血球の酸素放出能を惹起するのみならず、生体の抵抗血管で起こりうる酸素分圧の低下に呼応してATPを放出させる能力があるといえる。従って、R-T transitionを変化させることのできるすべての薬剤、及びこれらの薬剤により処理された赤血球は、ATP放出を活性化し得る、付加価値のついた血液として本発明に含まれ、「付加価値輸血」に使用することができる。

#### 【0036】

ATPは生体内では血管内皮細胞に作用し、NOを増加させて血流を増加させる。また、肝臓では肝細胞膜にATPが作用して毛細胆管の律動的収縮が活性化して胆汁分泌が活性化する。さらにまた、T-状態安定化剤は、赤血球が低酸素環境に到達すると発揮する生物作用、すなわち酸素放出と血管拡張を増強してショックを改善する生物作用を有することから、末梢循環改善薬として使用することができる。

## 2. T-状態又はR-状態安定化

### (1) 安定化物質

本発明において、ヘモグロビンをT状態に安定化させて赤血球からATPを遊離させる作用を持つ物質(「T-状態安定化物質」という)としては、例えば、Bezafibrate、NO、NO誘導体、二酸化炭素、水素イオン等を挙げることができ、これらの物質の少なくとも1つを、単独で又は適宜組み合わせ使用することができる。但し、T-状態安定化物質は上記例示した物質に限定されるものではない。

#### 【0037】

T-状態安定化物質は、赤血球からATPを遊離させる作用を有する限り、上記に挙げた薬物の一部改変体又は誘導体でもよい。

#### 【0038】

ヘモグロビンをT-状態に安定化する方法は公知であり(Kilmartin JV, Rossi-Bernardi L, Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates. Physiological Review, vol.53, 836-890 (1973))、例えば二酸化炭素、ATP、イノシトールヘキサキスホスフェート(Inositol hexakisphosphate)、水素イオン( $H^+$ )、塩素イオン等( $Cl^-$ )で処理することにより行うことができる。

#### 【0039】

また、ヘモグロビンをR-状態に安定化させて赤血球からのATPの遊離を抑制する作用を持つ物質(R-状態安定化物質という)としては、例えば一酸化炭素(CO)を挙げることができる。但し、R-状態安定化物質は上記例示した物質に限定されるものではない。

#### 【0040】

### (2) ATPの遊離又はその抑制

上記のようにT-状態に安定化された赤血球は、ATPを遊離する機能を有する。「ATPを遊離する」とは、ATPの放出曲線が、酸素分圧との関係でヘモグロビンに観察される通常のシグモイド曲線をとらず、その通常のシグモイド曲線がとる変曲点以下の酸素分圧ではそのシグモイド曲線により示されるATP放出量と同量又はそれよりも多量のATPを放出し、変曲点よりも高い酸素分圧(例えば100 mmHg  $PO_2$ )であっても前記通常のシグモイド曲線により示されるATP放出量よりも多量のATPを放出することを意味する(例えば図1の「bezafibrate」の曲線)。但し、本発明においては、ATP放出の促進は、酸素分圧100 mmHg以下、好ましくは40~80 mmHgにおいて行われる。

#### 【0041】

また、R-状態に安定化された赤血球は、ATPの遊離を抑制する機能を有する。「ATPの遊

離を抑制する」とは、ATPの放出曲線が、酸素分圧との関係でヘモグロビンに観察される通常のシグモイド曲線をとらず、放出されるATP量は、その通常のシグモイド曲線がとる変曲点以下の酸素分圧であってもそのシグモイド曲線により示されるATP放出量よりも少量であり、変曲点よりも高い酸素分圧では、前記通常のシグモイド曲線により示されるATP放出量と同等又はそれよりも少量であることを意味する（例えば図1の「CO-Hb」の曲線）。但し、本発明においては、ATP放出の抑制は、酸素分圧100 mmHg以下、好ましくは40～80 mmHgにおいて行われる。なお、細動脈の酸素分圧は前記の40～80 mmHgである。

### 3. 医薬組成物

本発明の医薬組成物のリソースとなる赤血球は、献血保存血、自己血輸血用血液が望ましいが、これに限定されるものではない。

#### 【0042】

##### (1) T-R transitionを調節する薬剤

本発明のT-R transitionを調節する薬剤をATP遊離促進剤又はATP遊離抑制剤として使用する場合は投与形態としては、通常の静脈内又は動脈内等の全身投与、あるいは手術後の再建血管からの局所投与をすることができる。

#### 【0043】

従って、カテーテル技術、外科的手術等と組み合わせた投与形態を採用することも可能である。本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えば肝疾患手術後の場合の投与量は、1日1回あたりヘモグロビン 2.0 g/dlの濃厚パックで200～800 mL程度であり、1回又は複数回投与される。複数回投与の場合は、1日あたり3～4回に分けてもよい。

##### (2) T-R transitionを調節する薬剤で処理された赤血球製剤

救急救命に必要な酸素輸液の開発研究は、これまで期限切れ残余献血血液からヘモグロビンを精製し、これを生体適合性材料を用いて修飾あるいは封入した製剤の開発が主体であった。

#### 【0044】

近年の研究により、赤血球が血管内の酸素濃度を感知してNOなどの低分子のガスや有機酸を活発に放出又は回収し、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。これは、赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性を示すものである。換言すれば、これまでの精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では、赤血球が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。このような血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球が血管機能制御に関与することを示す分子機構の解明は、特にショックの救急救命への応用を考える上で極めて重要であり、細胞膜機能を維持したまま、高い酸素運搬能と微小循環血流保持機能を付与した新しい赤血球製剤開発が不可欠である。

#### 【0045】

本発明は、膜透過性の高い低分子ガス（例えばNO, CO）による蛋白質機能修飾技術を利用した赤血球保存技術の向上と付加価値添加技術による、篤志で得られた献血血液の有効利用を展開する。具体的には $\alpha$ -NOHb（NOで固定したヘモグロビン）あるいはCO-Hb（COで固定したヘモグロビン）を利用し、少ないヘモグロビン量で、多量のヘモグロビンが有する酸素の量と同等の量の酸素を運搬できるような赤血球製剤の実用的創製法、あるいは新規赤血球保存法をそれぞれ開発し、これらのプロダクトの実用化を目指すことを目的とする。

#### 【0046】

本発明では、血液製剤を投与される個体においてヘム解毒の負担を軽減することができるメリットも見逃せない。正常個体と異なり、外科手術後やショック病態ではサイトカイン血症や低酸素ストレスによりヘム解毒酵素であるheme oxygenaseが誘導され、ヘムから

ビリルビンへの分解が異常に亢進することから(Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Gastroenterology. 120, 1227-1240 (2001)), 酸素輸送量あたりのヘムの絶対量を低下させることは、単に血液資源の節約という観点のみならず、それを投与される個体の高ビリルビン血症のリスクを軽減させることにつながるからである。

#### 【0047】

また、NO-Hbは、移植用グラフトの酸素化フラッシュ液として新規に応用することができる。通常、低温(4℃)の状態ではHb hemeと分子状酸素のaffinityは増加するため、再還流時の酸素輸送の向上には $\alpha$ -NOHbが適している。また再還流時に生じるoxygen paradoxを軽減するためには、逆にCO-Hbの応用が可能である。さらにラジカル分子でないCOはmild vasorelaxantとして応用が可能であり、組織にHbよりもCO affinityが高いヘム蛋白が存在する筋肉や脳ではHb-COによる血管拡張効果が期待できる。このような可能性も本研究により実験的に評価することにより、残血赤血球の新たな需要の創出に結びつけることができる。本発明において提案する $\alpha$ NO-RBC、CO-RBCの有効利用を行うことは、救急救命のQualityを向上させると共に、国民の篤志で得られた貴重な血液リソースの有効利用を考える上で極めて重要である。

#### 【0048】

Hb allosteric修飾による付加価値赤血球製剤を開発するには、(i) 血液体積の50%を占める赤血球が単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局所の酸素分圧変化やshear stressを感知して血管拡張物質を放出したり、血管収縮物質を吸収したりするmetabolic sinkとして作用していること、特に酸素の脱着等によるHb allosteric変化が本機能を制御しているという仮説の検証とその機構を解明すること、並びに、(ii) この概念を人工酸素運搬体に導入し、実用化を目指すことが必要である。上記(i)記載の内容を実証するために、本発明では $\alpha$ NO-Hb又はCO-Hbによる出血性ショックの蘇生効果を検討する。また、上記(ii)記載の内容を検討するために、本発明ではHbを修飾した赤血球を実験動物に適用する。

##### (i) $\alpha$ NO-Hb, CO-Hbによる出血性ショックの蘇生効果の検討

ラットのWigger's hemorrhagic shock protocolにしたがって40%脱血性ショックを惹起し、 $\alpha$ NO-Hb, CO-Hbを持つ赤血球(同種ラットから分離調整したもの)により蘇生を試みた。回復効果は肝臓微小循環の生体顕微鏡学的解析系を用いて比較検討した。微小循環の酸素供給だけでなくfunctional capillary density (FCD)、白血球接着、Kupffer cell activationなどを指標として比較検討した。Wigger's hemorrhagic shock protocolにしたがってラットを用いて40%脱血性ショックを惹起し、 $\alpha$ NO-Hb, CO-Hbを持つヒト赤血球(ヒト末梢血から分離調整したもの)により蘇生を試みた。

#### 【0049】

酸素乖離曲線は、2,3-DPGをはじめとする生体内分子や合成化合物の存在により右(または左)偏移することが古くより知られている。膜透過性に優れHbのヘムに結合するNO、CO等のガス状分子もHb allosteric調節分子である。

#### 【0050】

##### (ii) Hbを修飾した赤血球の実験動物への適用

ラットWigger's hemorrhagic shock protocolに従って40%脱血ショックを誘起し、 $\alpha$ NO-RBCによる蘇生を試みた結果、 $\alpha$ NO-RBCには毛細血管レベルでのpatencyを著しく改善し、胆汁分泌を著明に回復させる効果を確認した。また、本来酸素輸送能がないと考えられるCO飽和赤血球にもCOの結合していない通常の赤血球と同様の改善効果が確認された。また、ヒト末梢血を用いた検討では、 $\alpha$ NO-RBC、CO飽和赤血球及び通常の赤血球は全身のアシドーシスに対する改善効果を示すことが確認された。

#### 【0051】

以上のことから、本発明において作製された赤血球は、血管拡張、血流改善の治療に用いる医薬組成物として使用することができる。さらにまた、本発明において作製された赤血球は、アシドーシスやショックの治療、改善に用いる医薬組成物として使用することが

できる。

【0052】

本発明の赤血球は、免疫適合性とするために治療目的のレシピエント個体から得てもよく、ボランティアからの献血を用いてもよい。本発明において使用される赤血球は哺乳動物赤血球であり、好ましくはヒト赤血球である。

【0053】

本発明の赤血球は、例えば、以下の組織に生じる疾患について治療、予防または、検査を特異目的として用いることができる。

【0054】

消化器系：口腔、咽頭、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、すい臓など

呼吸器系：気管、気管支、肺など

泌尿器系：腎臓、膀胱など

心臓血管系：心臓、動脈、静脈

リンパ系：リンパ管、リンパ節、脾臓、胸腺

中枢神経系：脳（大脳、間脳、中脳、小脳）、延髄、脊髄

筋：骨格筋、平滑筋等

これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明の医薬組成物の使用対象とすることができる。本発明においては、例えば血管拡張、血流改善又はショック改善の目的とすることが好ましい。

【0055】

また、本発明においては、ATPを遊離する薬物を含有する赤血球を、虚血性疾患や循環器系疾患を治療するための医薬組成物として使用することができる。

【0056】

虚血性疾患及び循環器系疾患としては、例えば出血性ショック、敗血症性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、糖尿病による血管障害、あるいは、冠動脈狭窄症、四肢虚血性疾患、閉塞性動脈硬化症、虚血性潰瘍・壊死などが挙げられる。本発明の医薬組成物は、これらの疾患を治療するために用いられ、血流改善薬、または血管拡張薬としての作用を有する。

【0057】

また、本発明の医薬組成物は、酸塩基平衡障害（例えばアシドーシス）の治療薬あるいはショック改善薬として治療に用いられる。

【0058】

赤血球は、前記の通り酸素濃度変化によるヘモグロビンのアロステリー変化を介して、ATPを細胞外に遊離している。具体的には、赤血球は低酸素状態ではATPを遊離しやすく、酸素飽和状態ではATPを遊離しにくい。

【0059】

従って、血流の滞った箇所、例えば血管が血栓、血管肥厚、血管狭窄、血管閉塞等によって血液を通す容量が減少した又は無くなった箇所では、酸素を十分に含む新鮮血液を供給することができないため、そのような血流の滞った箇所の血液は低酸素状態になる。また、出血ショックによっても、低酸素状態を引き起こす。さらに、癌細胞の中心部分では、血管系が未発達であるため酸素の供給が十分ではなく、癌細胞が低酸素状態にある。このため、放射線治療では効率よく酸素ラジカルを産生できず、十分な治療効果を出すことができないという問題がある。さらに、細胞は多くの酸素を必要としているため、酸素の供給が止まった場合（例えば血流が断絶した場合）は、脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な症状に至ることがある。

【0060】

本発明の赤血球は、そのような低酸素状態においてATPを効果的に供給することを可能とするものである。

【0061】

赤血球内で産生され遊離したATPは、血管内皮細胞にある特異的受容体に作用し、NOを遊離して血管を弛緩、拡張させる。従って、血流の滞った血管を弛緩、拡張させることで血流を改善させることができる。

#### 【0062】

また、遊離したATPは、血液内で速やかにADPに分解される。分解によって産生されたADPは、血小板に存在する特異的受容体を介して血小板の凝集を引き起こす。従って、出血によって起きる低酸素状態を示す部位を、上記の機序によって効果的に止血をすることができる。

#### 4. 血液酸素含有量の測定方法

本発明により、赤血球は酸素濃度とATP放出量との関係ではヘモグロビンの酸素解離曲線と同様のシグモイド曲線を描くことが判明した。従って、本発明において低酸素性ATP放出量を測定することで、赤血球機能予備能の間接的測定が可能である。

#### 【0063】

本発明の血液酸素含有量の測定方法は、臨床検査、治療の場において有効である。また、本発明の測定方法を用いると、輸血血液の含有酸素量の測定又は汚血検査を簡便に実施することが可能となる。

#### 【0064】

用いる血液は、酸素含有量の測定対象から摂取する血液を利用する。摂取後速やかにATPを測定することが望ましい。採取量は、5~400 ml、好ましくは5~10 mlである。

#### 【0065】

血中ATPの測定には、市販の測定機器に測定対象血液を適用すればよい。

#### 【0066】

酸素含有量と血中ATP量の関係式をあらかじめ求めておき、求めた関係式に、測定で得られた血中ATP量を代入することで、試料中の酸素含有量を求めることができる。

#### 【0067】

次に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0068】

ヒト末梢血20 mLをヘパリン採血し、2000rpm、7分で遠心して赤血球沈渣を採取し、洗浄して $1 \times 10^7$  cells/mlの赤血球浮遊液をKrebs bufferで作製した。酸素濃度を0~150 mmHgで所望の値に調整したKrebs buffer 1.8 mLを含む密封キュベットを37℃でインキュベートし、マイクロリシンジで200  $\mu$ lの赤血球浮遊液を注入した。5分後に4℃の氷中に入れて反応を停止し、サンプル200  $\mu$ lを4℃のまま採取し、遠心して上清中のATPをluciferin assayにより定量的に測定した。正常赤血球は20 mmHg付近に変曲点を持つカーブになる(図1のシグモイド曲線)。赤血球に100 % COを1分間通気して作製したCO飽和赤血球は低位でATP放出が一定化し(図1「CO-Hb」の曲線)、 $10^{-4}$  mol/L (最終濃度)で処理したbezafibrateは高位でATP放出が一定化した(図1「bezafibrate」の曲線)。図1中、「\*」は正常酸素分圧(150 mmHg)時の測定値に対して有意に差があることを示す( $P < 0.05$ )。

#### 【実施例2】

#### 【0069】

本実施例では、一酸化炭素赤血球(CO-Hb)及びNO処理赤血球( $\alpha$ NO-Hb)のATP放出に対する影響を検討した。方法は上記実施例1に従った。NOの作用は、摂取した赤血球をアルゴン通気により完全脱酸素した後、NO-glutathioneをHb濃度に対して1:2の割合で添加し、数分後に遠心して回収した赤血球を用いて実験を行った。前記赤血球に含まれるヘモグロ빈は「 $\alpha$ NO-Hb」と表示した。

#### 【0070】

正常-Hb及びCO-Hbは実施例1と同様の結果を示し(図2)、 $\alpha$ NO-Hbは実施例1のbezafibrate

ibrateよりもさらに高位でATPの放出が一定化した(図2)。図2中、「\*」は正常赤血球(Hb)に対して有意に差があることを示す( $P<0.05$ )。

#### 【実施例3】

##### 【0071】

ヒト洗浄赤血球試料によるラット40%脱血ショック惹起性肝臓機能障害に対する回復効果

Wistar系雄性ラット(250~300 g)をPentobarbital sodium 50 mg/kgで筋注麻酔した。麻酔したラットの気管を切開し、大腿動脈にカテーテルを挿入した。さらに、総胆管にカテーテルを挿入し、胆汁分泌をモニターした。脱血ラインとして左頸動脈にもカニュレーションし、1~2 mL/minで脱血し、総脱血量が全身血液の40%になるまで脱血を続けた。脱血終了後15分のショック状態の後、各製剤を出血量に相当するHb量を調整して投与し、60分後に肝臓微小循環、胆汁流量、および動脈血のHb、重炭酸濃度pHよりbase excessを算出した(図3)。Base excessは通常、プラス2.5以上がalkalosis、マイナス2.5以下がacidosisを意味する。図3中、PSは出血量に相当する量を生理食塩水で蘇生(n=7)、COhRBCはCO飽和ヒト赤血球で蘇生(n=5)、hRBCは空気飽和ヒト赤血球で蘇生(n=5)、及び $\alpha$ NOhRBCはalpha subunitがNOで飽和されたHbを持つヒト赤血球で蘇生(n=7)したものである。また、図3中、「\*」は $P<0.05$ (PS群に比べて有意な変化)を、「#」は $P<0.05$ (hRBC群に比べて有意な変化)を示す。肝臓微小循環は、既報のビデオ強化型倒位型生体顕微鏡システムによりその動態を記録した。

##### 【0072】

まず各赤血球製剤を投与した際、肝臓の微小循環に当たる類洞血流が維持されている血管の密度は3種類の製剤を投与したいずれの群においても著明な改善効果が確認された(図3上パネル)。特に酸素を運搬できないと考えられるCO飽和赤血球(COhRBC)では肝臓の有効循環類洞密度はショック前の約90%まで回復した。これは発明者が報告したex vivoの肝臓におけるCOによる類洞血流維持作用(Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. J Clin Invest. 1995 Nov; 96(5): 2431-2437.)と矛盾しない結果であり、赤血球を、COを末梢組織に運ぶ担体として使用できることが初めて明らかにされたことになる。

##### 【0073】

一方、全身のアシドーシスに対する改善効果を検討する目的で、動脈血のHb及び重炭酸濃度pHによりBase excessを算出した。Base excessは通常、プラス2.5以上がアルカローシス(alkalosis)、マイナス2.5以下がアシドーシス(acidosis)を意味する。Base excessは、3製剤とも有意な改善効果が認められ、 $\alpha$ NOhRBCが最も強力な改善効果を発揮し、COhRBC、hRBCに比べても有意な改善効果が確認された( $\#P<0.05$ )。

##### 【0074】

これらの改善効果に加えて、肝臓全体のviabilityの指標である胆汁分泌改善効果では、 $\alpha$ NOhRBC、hRBC、COhRBCの順に改善効果が増強し、特に $\alpha$ NOhRBCではショック前に比べても有意な胆汁分泌増強効果が認められた。ATPは毛細胆管の律動的収縮運動の活性化を起こすことがin vitroで示されているが(Kitamura T, Brauneis U, Gatmaitan Z, Arias IM. Extracellular ATP, intracellular calcium and canalicular contraction in rat hepatocyte doublets. Hepatology. 1991 Oct; 14(4 Pt 1): 640-647.)、ATP分泌能の高い $\alpha$ NOhRBCが胆汁分泌活性化作用を示したことはこの事実と矛盾しない。いずれにせよ、CO-hRBCの投与は肝臓類洞血流の改善法として有用であり、 $\alpha$ NOhRBCの投与は肝臓の類洞血流回復に加えて全身の酸塩基平衡障害(例えばアシドーシス)の是正に有力な方法であることが示された。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0075】

【図1】酸素分圧とATP遊離との関係並びに飽和CO及びペザフィブラートの赤血球遊離作用を示す図である。

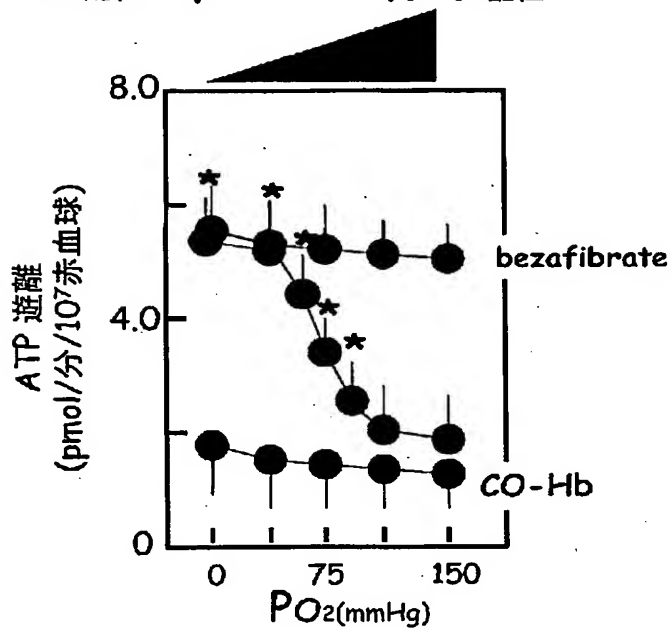
【図2】酸素分圧とATP遊離との関係並びに飽和CO及び $\alpha$  NO-Hbの赤血球遊離作用を示す図である。

【図3】ラットの全身血液体積の40%を脱血させた後にT-状態安定化赤血球を戻して60分後の肝臓微小循環の有効循環頻洞密度(FSD)、Base excess及び胆汁分泌の回復を示す図である。

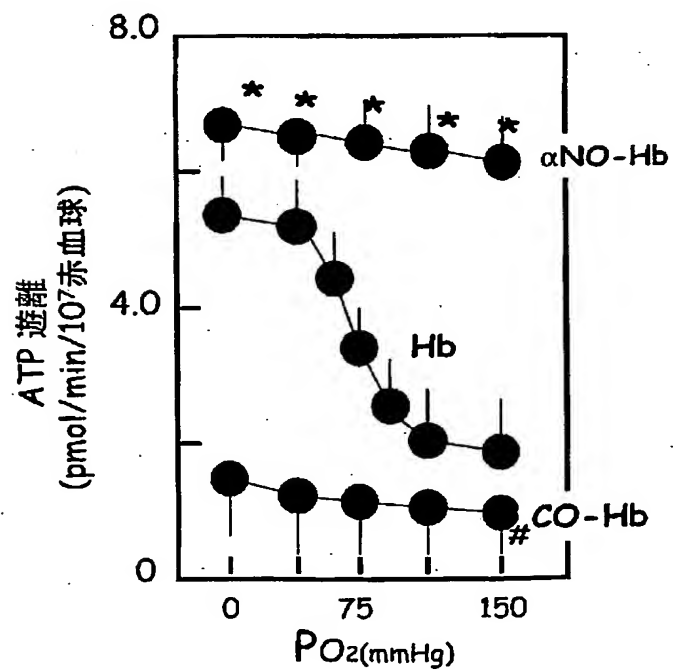
【書類名】図面

【図1】

5-配位 T R 6-配位

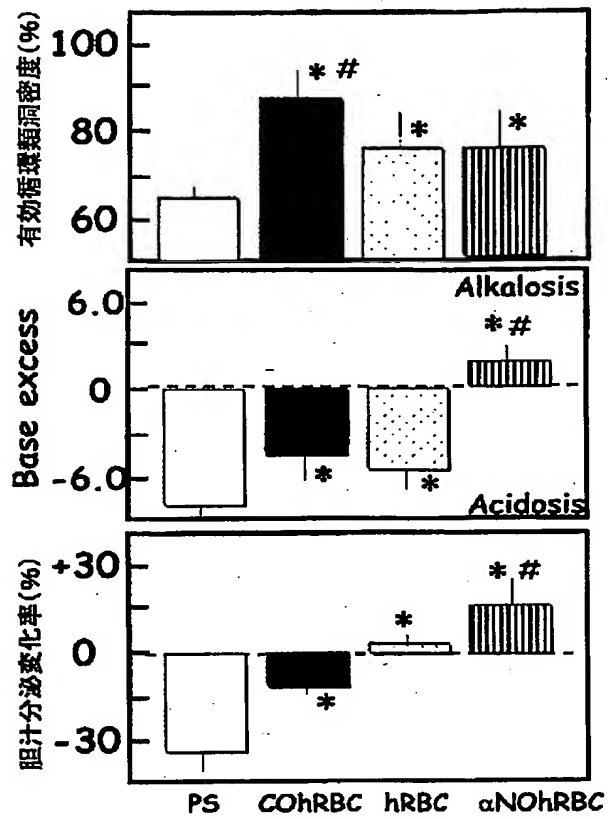


【図2】





【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態又はR-状態に安定化する物質を含む、赤血球からのATP遊離調節剤、並びに前記物質を含む医薬組成物の提供。

【解決手段】 赤血球中のヘモグロビンの構造をT-状態に安定化する物質を含む赤血球からのATP遊離促進剤、該促進剤を用いて赤血球からATPを遊離させる方法、赤血球中のヘモグロビンの構造をR-状態に安定化する物質を含む赤血球からのATP遊離抑制剤、該抑制剤を用いて赤血球からATPの遊離を抑制する方法。

【選択図】 図 1

特願 2004-022305

出願人履歴情報

識別番号

[899000079]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都港区三田2丁目15番45号

氏名

学校法人慶應義塾